

WB操作SOP

1.主要仪器

表1 实验所用主要仪器

所用仪器	仪器型号	公司
电泳仪	PP1152	CAVOY
电转仪	EPS600C	TANON
电泳槽	MP-8001	CAVOY
电转槽	VE-186	TANON
脱色摇床	TS-8S	QILINBEIER
凝胶成像系统	ChemiDoc™XRS+	Bio-rad
超声破碎仪	JY92-IIN	新芝
电子天平	PL-203	梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司
磁力搅拌器	79-1	常州澳华仪器有限公司
冷冻离心机	neofuge 15R	heal force
全功能微孔板检测仪	PerkinElmer	PerkinElmer

2.主要试剂

表2 主要试剂及其生产公司

试剂名称	货号	生产公司
RIPA lysis buffer	P0013B	碧云天
脱脂奶粉		伊利
PMSF	ST505	碧云天
BCA蛋白定量检测试剂盒	P0009	碧云天
SDS-PAGE凝胶制备试剂盒	ATO00035	普健生物
5*蛋白上样缓冲液	ATO00036	普健生物
ECL	K-12043-D10	武汉聚能译通生物公司
GAPDH	ATPA00013Rb	普健生物
HRP标记山羊抗兔	SA00001-2	武汉三鹰
HRP标记山羊抗小鼠	SA00001-1	武汉三鹰
TRIS	T8060	Solarbio
甘氨酸	G8200	Solarbio
SDS	S8010	Solarbio
蛋白预染marker	#26616	Thermo scientific

3.实验内容

3.1 样品制备

- (1) 弃去培养液，PBS洗一次。
- (2) 每孔加入150 μ l-250 μ l裂解液，用枪吹打数下，使裂解液和细胞充分接触水平置于冰上裂解10-20min。
- (3) 收集细胞沉淀及裂解液，12000rpm 4度离心3-5min。
- (4) 将上清转移到一个新的1.5mlEP管中。
- (5) 取1-2ul用于BCA试剂盒检测总蛋白含量。
- (6) 加入适量体积的5XLoading，混匀，煮5min。

3.2 SDS-PAGE电泳

按需要夹好灌制聚丙烯酰胺凝胶的玻璃板（1.0mm或1.5mm），将现配置好的SDS聚丙烯酰胺分离胶（8%、10%或12%）迅速加入玻璃板缝隙中至玻璃板的2/3处，用异丙醇封胶。待分离胶凝固后，倒出异丙醇，用滤纸吸出残留液体。将现配置好的5%的积层胶加到分离胶上，立即插入梳子。带胶完全凝固后拔出梳子用水冲洗加样孔。将电泳装置固定，加Tris-甘氨酸电泳缓冲液，按要求点加样品和预染Marker。将电泳装置与电源连接，将电压调到80V，待溴酚蓝跑到分离胶时，将电压调为120V，直到溴酚蓝跑到分离胶底部，关闭电源。

表1：分离胶各成分所需体积

试剂	分离胶浓度					
	8%	10%	12%	15%	18%	20%
水 (ml)	4.6	4.0	3.3	2.3	1.3	0.6
30%丙烯酰胺 (ml)	2.7	3.3	4.0	5.0	6.0	6.7
1.5MTris-Hcl (PH8.8)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
10%SDS (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
10%AP (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
TEMED (ul)	7ul (视实验室温度而定)					
总体积 (ml)	10	10	10	10	10	10

表2：浓缩胶各成分

试剂	浓缩胶浓度			
	5%			
水 (ml)	2	2.7	4	6
30% 丙烯酰胺 (ml)	0.5	0.7	1	1.5
1.0M Tris-HCl (PH6.8)	0.5	0.7	1	1.5
10% SDS (ml)	40	53	80	120
10% AP (ml)	30	40	60	90
TEMED (ul)	4	5.3	8	12
总体积 (ml)	3	4	6	9

3.3 Western blot 检测

(1) 转膜：将凝胶取下，除去积层胶和多余部分，在转膜缓冲液中浸泡；剪取和胶大小相等的4张滤纸和1张PVDF膜，用铅笔在膜的一角做一标记。将PVDF膜依次在100%甲醇中泡约1min，ddH₂O中2min，之后在转膜缓冲液中浸泡。将转移装置的阴极板放平，放一层用转膜缓冲液浸泡过的海绵，在海绵上整齐地放两层转膜缓冲液浸泡过的滤纸，用玻璃棒赶出气泡。将凝胶平放于滤纸上，精确对齐滤纸，赶走气泡。将处理好的PVDF膜放在凝胶上，做标记的一面朝下。将剩下的两张浸泡过的滤纸整齐地放在PVDF膜上，同样保证没有气泡。最后放一层转膜缓冲液浸泡过的海绵，将阳极板覆盖在海绵上，夹紧夹子。将装置置于电转槽中，加满预冷的转膜缓冲液，接通电源，200mA电转1.5h。

(2) 封闭：将电转好的PVDF膜取出用TBST洗一遍，用5% milk/TBST室温摇床封闭1h。

(3) 洗涤：用TBST漂洗2min。

(4) 一抗和靶蛋白结合：用1% BSA/PBST稀释一抗，用杂交袋将膜封闭起来，4°C冰箱过夜。

(5) 洗涤：用PBST洗涤3次，每次10min。

(6) 二抗和一抗温育：将PVDF膜放入用5% milk/PBST稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗中，室温摇床孵育1h。

(7) 洗涤：用PBST洗涤3次，每次10min。

(8) 显色：取等量的Enhanced Luminol Reagent和Oxidizing Reagent，用适量ddH₂O稀释，混匀后滴加在封口膜上。将PVDF膜的正面朝下接触发光试剂，显色1.5~2.0min，将PVDF翻转过来，用凝胶成像系统观察结果。

The end



• **一站式蛋白抗体发现服务**

重组蛋白 · 抗体 · 噬菌体文库 · 诊断原料

—— 武汉国家生物产业基地 · 光谷抗体发现与筛选公共服务平台 ——